

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad

Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de Diciembre de 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/138148 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 11/08 (2006.01) C12P 37/04 (2006.01)
C12N 9/84 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2007/070104

(22) Fecha de presentación internacional:

30 de Mayo de 2007 (30.05.2007)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P200601424 30 de Mayo de 2006 (30.05.2006) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **GRAZU**

BONAVIA, Valeria [UY/ES]; Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, E-28049 Cantoblanco (ES). **GUISAN SELJAS, Jose Manuel** [ES/ES]; Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, E-28049 Cantoblanco (ES). **FERNÁNDEZ LAFUENTE, Roberto** [ES/ES]; Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, E-28049 Cantoblanco (ES). **ABIAN FRANCO, Olga** [ES/ES]; Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, E-28049 Cantoblanco (ES). **MONTES FERNÁNDEZ, Tamara** [ES/ES]; Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, E-28049 Cantoblanco (ES). **MATEO GONZALEZ, Cesar** [ES/ES]; Instituto de Catalisis y Petroleoquímica, C/ Marie Curie, 2, E-28049

Cantoblanco (ES). **GONZALEZ GARCÍA, Ramón** [ES/ES]; Instituto de Fermentaciones Industriales, C/ Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). **HERMOSO DOMÍNGUES, Juan Antonio** [ES/ES]; Instituto de Química Física Rocasolano, C/ Serrano 119, E-28006 Madrid (ES). **GARCIA LOPEZ, Jose Luis** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, C/ Ramiro De Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,

para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: IMMOBILIZED AND STABILIZED MUTATED PENICILLIN G ACYLASE ENZYME, PROCESS FOR OBTAINING IT AND ITS APPLICATIONS

(54) Título: ENZIMA PENICILINA G ACILASA MUTADA INMOVILIZADA Y ESTABILIZADA, PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

(57) Abstract: The present invention describes different PGA enzyme mutants prepared by inserting one (1) Cys (in each mutant) in a different region of the surface of the enzyme which was relatively rich in lysine residues as well as immobilized forms on disulphide/epoxide supports and with additional mutations which increase their stability with respect to the effect of heat and organic solvents (300,000 times more stable than the corresponding soluble enzyme). The excellent stability of these enzymatic derivatives makes them very useful for catalysing different industrial processes of interest in organic and pharmaceutical chemistry: hydrolysis of penicillin, synthesis reactions in the presence or absence of solvents and enantioselective hydrolysis and synthesis reactions.

(57) Resumen: En la presente invención se describen diferentes mutantes de la enzima PGA preparados mediante la inserción de una (1) Cys (en cada mutante) en una región diferente de la superficie de la enzima que fuese relativamente rica en residuos lisina, así como formas inmovilizadas sobre soportes disulfuro-epóxido, y con mutaciones adicionales que incrementan su estabilidad frente al efecto del calor y los disolventes orgánicos (300.000 veces más estables que la correspondiente enzima soluble). La excelente estabilidad de estos derivados enzimáticos los hace muy útiles para catalizar diferentes procesos industriales de interés en química orgánica y farmacéutica: hidrólisis de penicilina, reacciones de síntesis en presencia o ausencia de disolventes y reacciones de hidrólisis y síntesis enantioselectivas.



WO 2007/138148 A1



*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

TITULO

ENZIMA PENICILINA G ACILASA MUTADA INMOVILIZADA y ESTABILIZADA,
PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y SUS APLICACIONES

5 CAMPO DE APLICACIÓN

La excelente estabilidad de estos derivados enzimáticos los hace muy
útiles para catalizar diferentes procesos industriales de interés en química
orgánica y farmacéutica: hidrólisis de penicilina, reacciones de síntesis en
presencia o ausencia de disolventes y reacciones de hidrólisis y síntesis
10 enantioselectivas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enzimas son capaces de catalizar los procesos químicos más
complejos en las condiciones experimentales y medioambientales más benignas.
15 En la mayoría de los casos, por razones económicas y tecnológicas, las enzimas
deben de emplearse en forma inmovilizada para poder así re-usarse o utilizarse
en reactores continuos. Así pues el empleo de enzimas inmovilizadas durante
numerosos ciclos de reacción en reactores industriales implica el desarrollo de
métodos muy sencillos de inmovilización de enzimas que permitan además
20 aumentar grandemente la estabilidad de estos excelentes, pero generalmente
lábilis, catalizadores biológicos.

La inmovilización covalente multipuntual parece ser el método más
adecuado para asociar inmovilización y estabilización de enzimas industriales. La
participación de numerosos residuos de la proteína en la unión covalente, a través
25 de brazos espaciadores cortos, a la superficie de soportes rígidos debe promover
una importante estabilización de las moléculas de enzimas inmovilizadas. Ahora,
las distancias relativas entre los diferentes residuos involucrados en la
inmovilización deben mantenerse prácticamente inalteradas durante cualquier
cambio conformacional inducido por cualquier agente inactivante (calor,
30 codisolventes, etc.). De este modo la intensidad de estos cambios
conformacionales, y consecuentemente la velocidad de inactivación de las
enzimas, deberían quedar muy reducidas. La bondad de esta hipótesis ha sido
corroborada por diferentes autores y especialmente por el presente grupo de

investigación que desarrolló un método general de estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual, a través de sus regiones ricas en residuos lisina, sobre soportes pre-existentes conteniendo una elevada densidad de grupos glioxil (grupos aldehído alifáticos muy próximos a la superficie del soporte).

5 La presente patente muestra la puesta a punto de un nuevo más eficaz de inmovilización-estabilización de enzimas por unión covalente multipuntual. Este método se basó en las siguientes hipótesis de partida:

a.- inmovilizar todas las moléculas de enzima por una única región de su superficie,

10 b.- inmovilizarlas en principio por cada una de las regiones ricas en residuos lisina,

c.- insertar, mediante mutagénesis dirigida, un residuo Cys en cada una de las regiones por las que se quiere inmovilizar la enzima,

15 d.- preparar soportes conteniendo una pequeña cantidad de disulfuros altamente reactivos y una gran cantidad de grupos epoxido,

e.- realizar la inmovilización uni-puntual orientada de cada una de las enzimas mutadas por intercambio tiol-disulfuro a través de la Cys insertada en cada región de la enzima y los residuos disulfuro del soporte, y

20 f.- fomentar una posterior inmovilización multipuntual entre los residuos lisina situados en las proximidades de la Cys insertada y los grupos epóxido del soporte.

De este modo, evaluando la estabilidad de los diferentes derivados obtenidos frente a diferentes agentes inactivantes se podrá detectar que región de la superficie de la proteína es la más decisiva en la inactivación de la enzima y, por lo tanto, la zona que más interesa rigidificar, si se pretende aumentar la estabilidad de la enzima.

Posteriormente, se podría enriquecer (también por técnicas de Biología Molecular) esa región con nuevos residuos lisina y obtener derivados todavía más estabilizados.

30 Finalmente, utilizando estos mutantes altamente enriquecidos en residuos lisina alrededor de una Cys altamente reactiva (no sólo por intercambio tiol-disulfuro) se evaluarán otras alternativas (soportes epóxido monofuncionales, soportes glioxil, etc.) para lograr los máximos efectos estabilizantes.

Esta enzima Penicilina G acilasa es utilizada actualmente en la industria farmacéutica para al hidrólisis de Penicilina G y cefalosporina G para producir 6 APA y 7ADCA respectivamente. Además, la enzima puede utilizarse en la reacción de síntesis de antibióticos betalactámicos semi-sintéticos, tanto en
5 medios con alto contenido en codisolventes utilizando los sustratos sin activar, como en medio acuosos utilizando el donador de acilo activado. Dada su relativa baja especificidad por los nucleófilos, la enzima también tiene interés para resolver mezclas racémicas de aminas y alcoholes, o para la síntesis de amidas.

En algunas de estas reacciones la estabilidad de la enzima reduce el
10 margen de condiciones que pueden utilizarse (fundamentalmente la concentración de disolventes orgánicos, pro lo que la preparación de enzimas inmovilizadas con mayor estabilidad seria muy importante.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 Descripción Breve

En la presente invención se describen diferentes mutantes de la enzima PGA preparados mediante la inserción de una (1) Cys (en cada mutante) en una región diferente de la superficie de la enzima que fuese relativamente rica en residuos lisina. Cada mutante se inmovilizó sobre soportes disulfuro-epóxido y de
20 ese modo la inmovilización se dirigió selectivamente sobre la Cys insertada y posteriormente la unión covalente multipuntual enzima-soporte se promovió por reacción ente los aminos cercanos a cada Cys insertada y los grupos epóxido del soporte. De este modo se descubrió que la región próxima al amino ácido 380b era una región clave para la estabilización de la enzima frente al efecto del calor y
25 los disolventes orgánicos. Esta región se enriqueció (por mutagénesis dirigida) en Lys superficiales adicionales y los mutantes obtenidos se inmovilizaron, a través de esta región, sobre diferentes soportes. Los mejores resultados se obtuvieron sobre soportes conteniendo grupos glioxil, grupos aldehído alifáticos de cadena corta. Utilizando geles de agarosa al 10% activados con grupos glioxil se
30 consiguieron derivados que eran 300.000 veces más estables que la correspondiente enzima soluble. La excelente estabilidad de estos derivados enzimáticos los hace muy útiles para catalizar diferentes procesos industriales de interés en química orgánica y farmacéutica: hidrólisis de penicilina, reacciones de

síntesis en presencia o ausencia de disolventes y reacciones de hidrólisis y síntesis enantioselectivas.

A partir de este planteamiento completamente original y combinando técnicas de Biología Molecular y técnicas de Diseño de Soportes Activados “a medida”, se ha logrado finalmente un método muy sencillo de inmovilización y estabilización muy drástica de enzimas industriales. El método ha sido puesto a punto utilizando la enzima penicilina G acilasa (de gran interés industrial por las múltiples biotransformaciones que es capaz de catalizar), aunque este nuevo método de inmovilización-estabilización de enzimas sería igualmente válido para la inmensa mayoría de enzimas industriales.

Descripción Detallada

Diseño de soportes disulfuro-epóxido a medida

El primer paso es detectar las zonas mas relevantes para la estabilidad de la enzima, para ello es preciso dirigir la inmovilización por las diferentes zonas ricas en residuos reactivos, de forma que se puedan detectar las zonas en las que la estabilización conseguida sea mayor.

Los soportes epoxido reaccionan muy lentamente con los grupos nucleófilos de las enzimas, de hecho si las proteínas no se adsorben al soporte por algún motivo, en principio la inmovilización sobre soportes epóxido no es significativa. De esta forma, los soportes epóxidos requieren de algún tipo de grupo o propiedad que permita la adsorción previa de las enzimas sobre la superficie, p.e. la mayoría de los soportes comerciales son hidrofóbicos y se recomienda su uso a elevada fuerza iónica.

Para ello se modificaron los soportes epóxido comerciales (Eupergit C de Röhm-Hass) con diferentes concentraciones de dos reactivos diferentes (ditiotretitol (DTT) y sulfuro sódico). De este modo se obtuvieron soportes parcialmente modificados con diferentes concentraciones de grupos tiol situados a diferente distancia de la superficie del soporte: con un brazo espaciador (modificación con DTT) y sin brazo espaciador (modificación con sulfuro sódico). Posteriormente, los soportes se activaron con 2,2'-dipiridil disulfuro (2PDS) y así se obtuvieron grupos disulfuro altamente reactivos sobre el soporte, rodeados de muchos grupos epóxido. Se comprobaron que estos soportes no podían

inmovilizar enzimas que carecieran de grupos tiol (naturales o insertados) y que la velocidad de inmovilización sobre los mismos era varios ordenes de magnitud mayor a la observada con grupos que solo tenían grupos tiol.

De esta forma disponíamos de un soporte capaz de inmovilizar de
5 proteínas específicamente por grupos tiol insertados en la superficie de la proteína

2.- Diseño de mutaciones dirigidas de la superficie de la PGA para insertar grupos Cys en distintas zonas:

10 Se estudió la superficie de la enzima penicilina G acilasa (PGA) y se detectaron todas las regiones ricas en residuos Lys, más o menos cercanas al centro activo de la enzima. En tres regiones se encontraron residuos Ser (B9, B201y A84) que se reemplazaron por Cys (unas mutaciones muy conservadoras) (Figura 1). En otros tres o casos no se encontró ningún residuo Ser superficial y
15 se tuvo que optar por reemplazamientos menos conservadores (GlnB380, GlnB112 y AlaB361) (Figura 2).

Las enzimas mutadas tenían una actividad específica muy similar a la enzima sin mutar (del orden de 25-30 UI/mg de proteína) y además poseían la misma estabilidad térmica e idénticos perfiles actividad-pH. Parece que, tal como
20 predecía la simulación matemática, las mutaciones realizadas apenas afectaban a la estructura-función de la PGA.

3.- Inmovilización- Estabilización de las enzimas mutadas por unión covalente multipuntual sobre soportes disulfuro-epóxido

25 Se comprobó que la PGA nativa no se inmovilizaba de forma significativa sobre los nuevos soportes tiol epóxido. Sin embargo, las distintas enzimas con una Cys superficial si se inmovilizaban sobre el soporte.

Se realizó la inmovilización dirigida de las enzimas mutadas sobre soportes disulfuro epóxido a pH neutro para favorecer la inmovilización por intercambio tiol-disulfuro. Posteriormente, se promovió la posterior interacción covalente
30 multipuntual incubándolos derivados a pH alcalino para aumentar la reactividad de los residuos lisina situados en el entorno de las Cys insertadas e involucradas en la inmovilización dirigida. Finalmente, los grupos epóxidos remanentes se

bloquearon con glicina para evitar efectos indeseables promovidos por una cierta hidrofobicidad de los soportes empleados. Como blancos de referencia se utilizaron soportes disulfuro-epóxido bloqueados con glicina donde solo era posible la inmovilización dirigida de las enzimas mutadas a través de una única unión enzima-soporte.

En todos los casos se comprobó la formación de una unión covalente multipuntual entre las enzimas mutadas y los soportes disulfuro epóxido (al menos un enlace amino-epóxido por cada una de las dos subunidades de la enzima más el enlace disulfuro). A pesar de ello la estabilización de los diferentes derivados era muy diferente: en algunos casos la inmovilización multipuntual apenas tenía efectos estabilizantes y en el mejor de los casos (mutante B380 cercano al centro activo de la enzima) se obtuvieron unos factores de estabilización de 12-20 veces frente al efecto desestabilizante del calor y los codisolventes. También este mutante exhibió unas propiedades catalíticas muy interesantes (bastante mejores que las de la enzima nativa) en biotransformaciones de interés: hidrólisis enantioselectiva de mezclas racémicas de esteres quirales y la síntesis cinéticamente controlada de enlaces amido.

4.- Enriquecimiento en grupos amino de la superficie de la PGA en torno al residuo B380

Gracias al planteamiento realizado pudimos descubrir una región de la enzima (alrededor del amino ácido B380) que era clave para la estabilización y la mejora de sus propiedades catalíticas. Posteriormente procedimos a enriquecerla en 8 nuevos residuos lisina para mejorar su rigidificación por unión covalente multipuntual sobre soportes disulfuro-epóxido.

Las mutaciones realizadas fue cambiar por Lys los siguientes residuos: ArgB437, AspA61, ThrA121, AsnB110, AspB381, AsnB457, GluB468 y ThrB470 (Figura 3).

Estas mutaciones reducían la actividad específica de la enzima en un 50% y su termo-estabilidad a pH 7 por un factor de 40. Al enriquecer una en Lys una zona ya rica en Lys, se puede asumir que posiblemente esa nueva zona sea la más rica en residuos aminos de toda la superficie de la enzima. De esta forma,

ahora había dos características de esta zona que permitían orientar la molécula en el entorno al residuo B380: la Cys y la mayor densidad de grupos Lisina.

5.- Inmovilización sobre diferentes soportes (Epóxido, tiol-epoxido o Glioxil)

5 La presencia, incluso de bajas concentraciones, de grupos disulfuro en la superficie del soporte puede impedir una perfecta congruencia geométrica entre las nuevas enzimas mutadas (enriquecidas en aminos en la zona más sensible para la estabilidad de la enzima) y los soportes epóxido altamente activado. Además, los soportes Eupergit pueden que no presenten superficies internas demasiado
10 grandes (sean más bien mallas de fibras relativamente finas) y por ello no sean los soportes ideales para una unión covalente multipuntual muy intensa entre enzimas y soportes. Por ello, se evaluó otros métodos de inmovilización de estas enzimas altamente aminadas para ver si mejorábamos su estabilidad térmica:

 a.- inmovilización covalente de sobre soportes epóxido mono-funcionales a
15 pH neutro. Las enzimas conteniendo un grupo tiol (la Cys insertada) reaccionan lentamente con los soportes epóxido monofuncionales pero lo hacen mucho más rápidamente que las enzimas nativas sin Cys insertada. Los derivados obtenidos por este procedimiento tenían un factor de estabilización de 1,500 con respecto a los derivados unipuntuales en experimentos de inactivación térmica. Parece que
20 efectivamente la presencia de grupos disulfuro puede reducir la intensidad de la rigidificación de la enzima.

 b.- inmovilización sobre soporte glioxil-agarosa. Esta inmovilización ocurre a través de las regiones de la enzima ricas en residuos lisina con soportes formados por fibras muy gruesas que pueden promover una intensa multi-
25 interacción con enzimas. De hecho, la enzima mutada enriquecida se inmoviliza mucho más rápidamente que la enzima nativa (unas 15 veces más rápido) y ello parece indicar que efectivamente se está inmovilizando mayoritariamente la enzima a través de la nueva región enriquecida en residuos Lys (alrededor del amino ácido B380). Ahora los derivados mostraban un factor de estabilización de
30 un factor de varios cientos de miles veces más estable con respecto a los derivados unipuntuales. De hecho, esta enzima mutada comparada en forma libre con la enzima nativa era 40 veces menos estable que la enzima nativa, mientras

que comparando las enzimas inmovilizadas, este derivado era dos ordenes de magnitud mas estable que la enzima nativa inmovilizada sobre un soporte similar.

La inmovilización sobre soportes disulfuro-epóxido permite detectar las regiones claves para la estabilización de enzimas y sin embargo, una vez optimizadas estas regiones (enriquecidas en residuos lisina) la inmovilización sobre soportes glioxil permite obtener unos efectos estabilizantes mucho mayores.

DESCRIPCIÓN DE LA FIGURAS

Figura 1: Representación en Grasp de la superficie de la PGA. En verde: serinas a mutar por las cisteínas. En azul lisinas; amarillo cadena α de la PGA y en gris cadena β de la PGA.

Figura 2: Representación en Grasp de los residuos seleccionados para ser reemplazados por cisteína. En rojo residuos a mutar por cisteínas, en azul lisinas, amarillo cadena α de la PGA y en gris cadena β de la PGA.

Figura 3: Representación en Grasp de los residuos seleccionados para ser reemplazados por lisinas cara frontal PGA cerca de la CysB380. En verde CysB380, negro AspA61, rosa ThrA121, naranja AsnB110, marrón AspB381, celeste ArgB437, azul asnB457, rojo Glub468, violeta ThrB470, amarillo cadena α de la PGA y en gris claro cadena β de la PGA.

Figura 4: Cinética de inactivación térmica de derivados bifuncionales de los distintos mutantes de cisteína. La inactivación se realizó a pH 7 (fosfato de sodio 50 mM) y 55°C. Derivados bifuncionales: (⌘) CysA86-PGA, (·) CysB9-PGA, (*) CysB112-PGA, (⌘) CysB201-PGA,, (⌘) CysB361-PGA, (⌘) CysB380-PGA; Derivado control: (⌘) CysB380-PGA.

Figura 5: Inactivación frente a dioxano de derivados bifuncionales de los distintos mutantes de cisteína. La inactivación se realizó con 60% dioxano a pH 7 (fosfato de sodio 10 mM) y 4°C. Derivados bifuncionales: (⌘) CysA86-PGA, (·) CysB9-PGA, (*) CysB112-PGA, (⌘) CysB201-PGA,, (⌘) CysB361-PGA, (⌘) CysB380-PGA; Derivado control: (⌘) CysB380-PGA.

Figura 6: Curso de síntesis cinéticamente controlada (SCC) de L-mandelil-glicinamida. Catalizada por: (⌘) derivado monofuncional y (⌘) bifuncional de CysB380-PGA y (*) derivado bifuncional de CysB112-PGA. Los derivados control

y bifuncionales de los demás mutantes presentaron cursos de reacción similares a los de los derivados control de CysB380-PGA y el derivado bifuncional de CysB112-PGA. Las reacciones se realizaron a 25°C, pH 7.5 y las concentraciones de sustratos fueron 50mM de glicinamida y 10mM (R) de mandelato de metilo.

5 Figura 7: Cinética de inmovilización sobre soporte glioxil-agarosa. (▲) CysB380-PGA, (⊗) CysB380(4Lys)-PGA, (⊛) CysB380(4Lys)-PGA, y (◆) CysB380(8Lys)-PGA. La inmovilización se realizó con una relación volumen de enzima:g de soporte 50:1 en tampón bicarbonato de sodio pH 10 0.1 M a 4°C.

Figura 8: Cinética de la cinética de inactivación frente a dioxano del
10 derivado CysB380 (8 Lys)-PGA-glioxil y de derivados reportados como muy estables en la literatura. La inactivación se realizó con 60% dioxano a pH 7 (fosfato de sodio 10 mM) y 4°C. Derivados glioxil-agarosa de: (◆) PGA nativa, (◆)CysB380(6Lys)-PGA, (⊛) Derivado de la PGA nativa preparado sobre Eupergit C preparado a alta fuerza iónica. (⊛) Derivado comercial de PGA (Fluka).

15

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Ejemplo 1.- Prueba de la inmovilización dirigida.

Inmovilización de enzimas con Cys insertadas y enzima nativa en soportes tiol reactivo-epoxido La enzima nativa no se inmoviliza a pH 7 y 10 mM de fosfato
20 en los soportes tiol reactivos, mientras que las enzimas con Cys si que se inmovilizaban en los soportes tiol reactivo, tanto solo con grupos tiol reactivos como tiol-epoxido, a una velocidad idéntica. Esto demuestra que se está inmovilizando fundamentalmente las enzimas por la nueva Cys.

25

30

Enzima	% Inmovilización	
	Na ₂ S(PyS ₂)-epóxido	Na ₂ S(PyS ₂)-glicina (*)
PGA nativa	2	0
CysA86-PGA	90	86
CysB9-PGA	91	88
CysB112-PGA	85	89
CysB201-PGA	88	84
CysB361-PGA	79	75
CysB380-PGA	86	81

Inmovilización de distintos mutantes en soportes bifuncionales de eupergit (7 µmol grupos tiol-reactivos/g soporte). La inmovilización se realizó a pH 7 (fosfato de sodio 50 mM) y temperatura ambiente. (*) soporte monofuncional bloqueado con glicina

2.- Inactivación térmica y en presencia de disolventes de los diferentes derivados.

Las enzimas solubles presentan exactamente la misma termoestabilidad, actividad y actividad/pH. Las Figuras 4 y 5 muestran las inactivaciones térmicas y en presencia de disolventes de las distintas enzimas mutadas sobre soportes epoxido-tiol reactivo, donde se ha conseguido cierta unión covalente multipuntual (demostrada por electroforesis en SDS donde no se liberan subunidades de la PGA, hay que destacar que el puente disulfuro debería de romperse en esas condiciones, así que al menos hay 3 uniones entra las enzimas y el soporte). Se observa que el mutante con la Cys en la posición 380 B era el más estable tanto en medio orgánico como en inactivaciones térmicas.

3.- Síntesis cinéticamente controlada catalizada por diferentes derivados de PGA nativa o mutada.

La Figura 6 muestra que el mutante con el aa. B 380 sustituido por una Cys e inmovilizado sobre soportes tiol-epóxido presenta mejores comportamientos en SCC que la enzima mutada en la posición B112 (que es similar a la forma

nativa) o el derivado en el que el mutante Cys B380 se une a soportes que tan sólo tiene grupos tiol-reactivos.

4.- Enantioselectividad de la enzima.

- 5 El mutante Cys B 380 inmovilizada sobre soportes epoxido-tiol-reactivo fue el único que vio mejoradas de forma significativa de la E de la enzima

10

Derivado bifuncional	E (R/S)
CysA86-PGA	7,8
CysB9-PGA	7,6
CysB112-PGA	8,4
CysB201-PGA	8,3
CysB361-PGA	8,1
CysB380-PGA	16,8

15

Enantioselectividad frente a (R) y (S) 2-fenilpropionato de etilo de los derivados bifuncionales de los distintos mutantes de Cys de PGA. Las condiciones de hidrólisis fueron 1 mM (R) o (S) 2-fenilpropionato de etilo en fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 a 25°C.

20

5.- Inmovilización sobre soportes glyoxyl de las enzimas enriquecidas en grupos KLys en el entorno del residuo B 380.

- 25 La Figura 7 muestra como las enzimas con Lys adicionales se inmovilizan mucho mas rápido que la enzima nativa, confirmando que sobre estos soprotes estos mutantes se inmovilizan de forma preferente por la zona B 380.

6.- Estabilidad de los derivados de enzimas enriquecidas en Lys en el entorno de el residuo B 380 inmovilizadas sobre soportes glyoxyl agarosa.

30

Estas enzimas están mucho más estables que las enzimas solubles o que la enzima unida a soportes tiolreactivos, Eupergit or Eupergoit con grupos tiol reactivos y epóxido, en todas las condiciones de pH, T y presencia de agentes distorsionantes estudiados. A modo de ejemplo, se presenta en la Figura 8 la

inactivación del nuevo derivado y los derivados glyoxyl-agarosa de la enzima nativa, as como otros derivados comerciales. Puede apreciarse que el nuevo biocatalizador es mucho más estable que cualquiera de las otras preparaciones ensayadas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento de inmovilización de la enzima penicilina G acilasa basado en la promoción de una inmovilización covalente multipuntual muy intensa a través de grupos amino, y de otros nucleófilos, situados en las proximidades del amino ácido 380b de la superficie de la enzima.
5
- 2.- Un procedimiento de inmovilización de la enzima penicilina G acilasa según reivindicación 1 en el cual el amino ácido Gln 380b de la superficie de la enzima es reemplazado, por mutagénesis dirigida, por un residuo Cys.
- 3.- Un procedimiento de inmovilización de la enzima penicilina G acilasa según reivindicación 2 en el que la superficie de la enzima, en las proximidades del residuo 380b, es enriquecida en residuos Lys adicionales en la superficie de la enzima por mutagénesis dirigida.
10
- 4.- Un procedimiento de inmovilización de la enzima penicilina G acilasa según reivindicación 3 en el que los residuos Lys insertados en la superficie de la enzima reemplazan a los siguientes amino ácidos de la enzima nativa: ArgB437, AspA61, ThrA121, AsnB110, AspB381, AsnB457, GluB468 y ThrB470.
15
- 5.- Un procedimiento de inmovilización de la enzima penicilina G acilasa, según reivindicaciones 2 a la 4, en los que la enzima se inmoviliza sobre soportes disulfuro-epóxido conteniendo una baja concentración (hasta 10 μ moles/gramo) de disulfuros altamente reactivos y una alta concentración de grupos epóxido (desde 25 hasta 200 μ moles / gramo de soporte).
20
- 6.- Un procedimiento de inmovilización de la enzima penicilina G acilasa, según reivindicaciones 2 a la 4, en los que la enzima se inmoviliza sobre soportes epóxido monofuncionales conteniendo una alta concentración de grupos epóxido, entre 20 y 200 μ moles de epóxido/gramo de soporte.
25
- 7.- Un procedimiento de inmovilización de la enzima penicilina G acilasa, según reivindicaciones 3 y 4, en los que la enzima se inmoviliza sobre cualquier tipo de soporte conteniendo una elevada concentración de grupos glioxil, entre 10 y 200 μ moles de glioxil/gramo de soporte.
- 8.- Un procedimiento de inmovilización de la enzima penicilina G acilasa, según reivindicaciones 5 a la 7 en el que la unión multipuntual enzima-soporte activado se optimizaba por incubación de la enzima inmovilizada a temperaturas
30

moderadas, entre 4 y 30°C, y a pHs moderadamente alcalinos, entre pH 8.0 y pH 11.0.

9.- Enzima penicilina G acilasa inmovilizada obtenida según las reivindicaciones 1 a la 8.

- 5 10. Uso de la enzima penicilina G acilasa según la reivindicación 9 en procesos industriales de producción de penicilina.

1/4

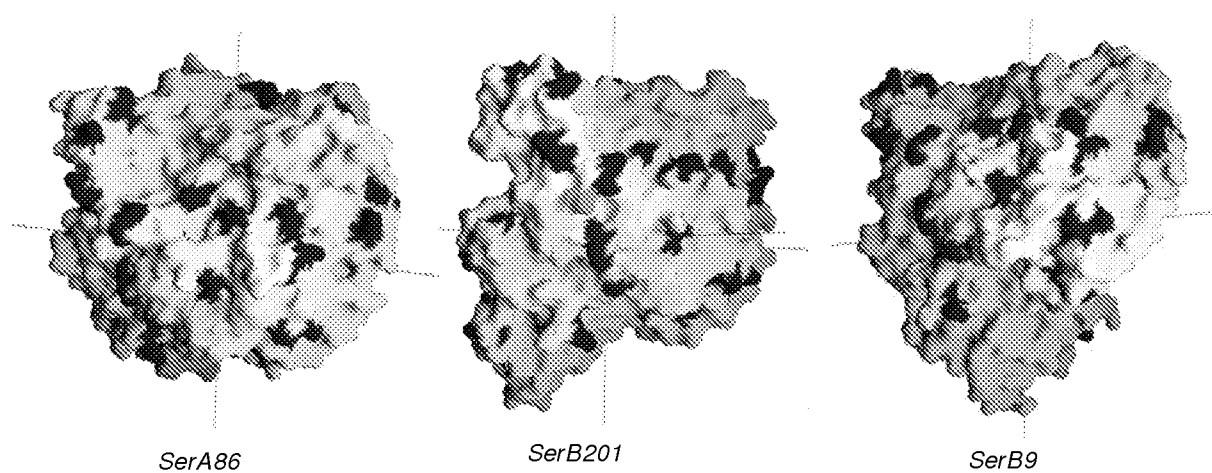


Figura 1

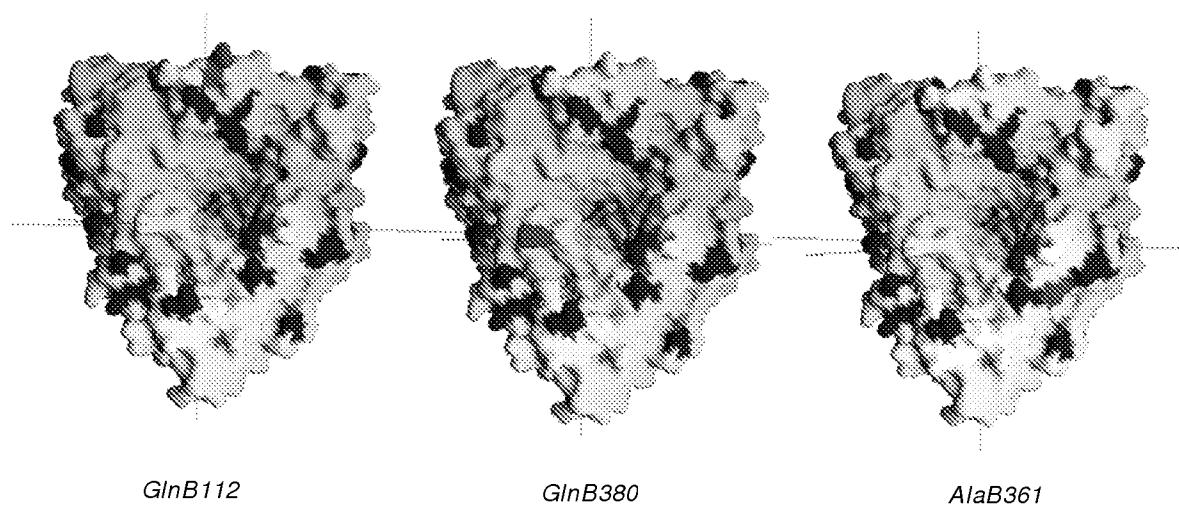


Figura 2

2/4

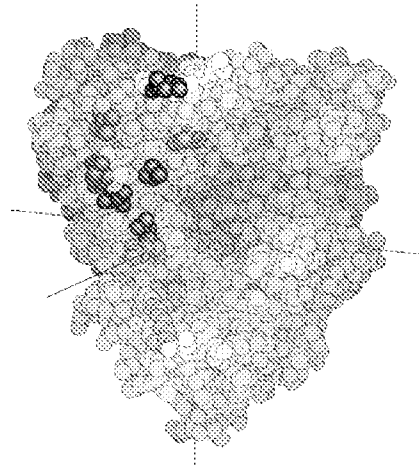


Figura 3

% Actividad remanente

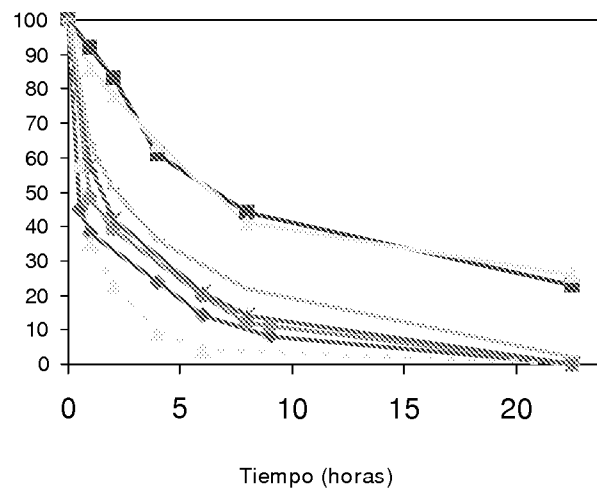


Figura 4

3/4

% Actividad Remanente

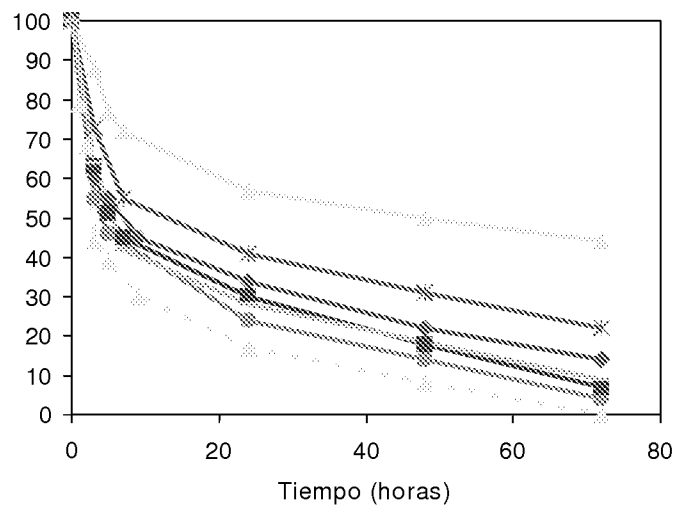


Figura 5

% Síntesis

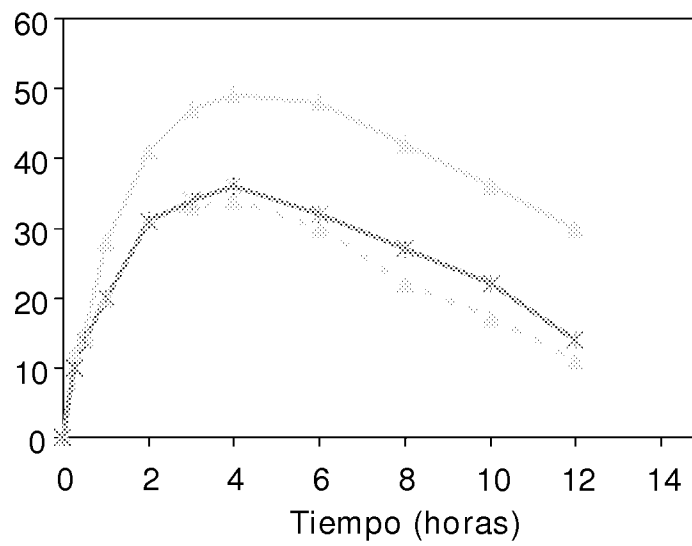


Figura 6

4/4

% Actividad remanente

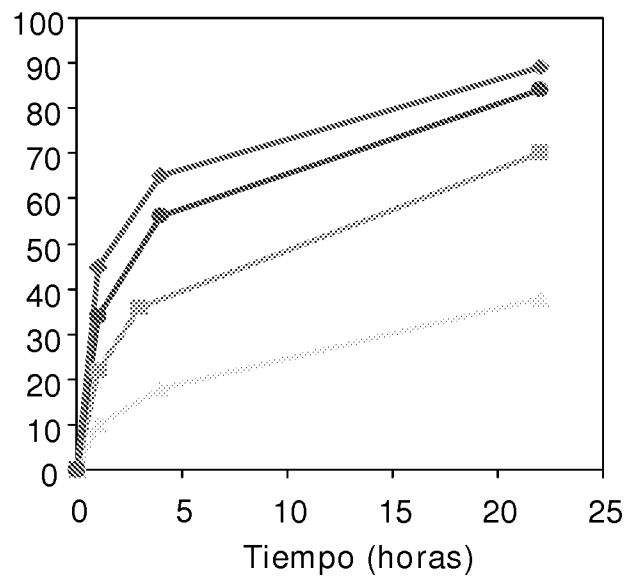


Figura 7

% Actividad remanente

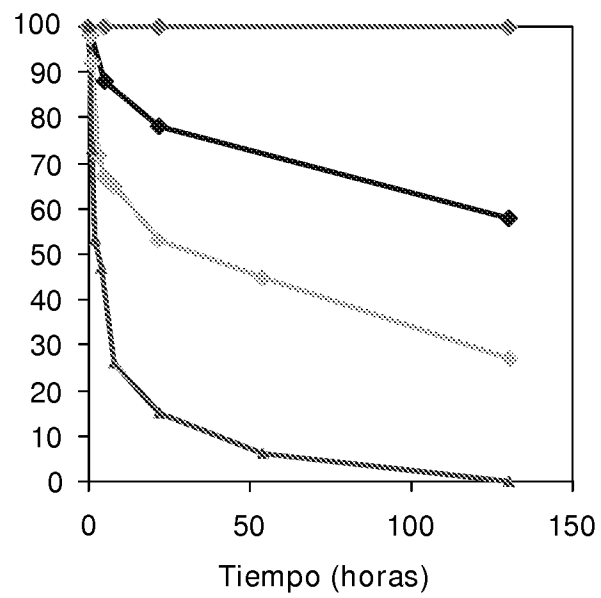


Figura 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2007/070104

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT,EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, STN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRAZÚ BONA VÍA, M.V. Resumen de la Tesis Doctoral: Estabilización de penicilina G acilasa por inmovilización covalente multipuntual dirigida. Mutagénesis de la superficie de la enzima para mejorar la complementariedad enzima-soporte activado [en línea]. Universidad Autónoma de Madrid. Año 2005 [recuperado el 01-10-2007]. Recuperado de Internet: <URL:http://www.kriptia.com/QUIMICA/BIOQUIMICA/GENETICA_BIOQUIMICA/1	2, 4-10
A	ABIAN, O. Stabilization of penicillin G acylase from Escherichia coli: site-directed mutagenesis of the protein surface to increase multipoint covalent attachment. Applied and Environmental Microbiology. February 2004. Vol. 70, Nº 2, pages 1249-1251. ISSN 0099-2240 (the whole document).	2, 4-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02.October.2007 (02.10.2007)

Date of mailing of the international search report

(02/10/2007)

Name and mailing address of the ISA/

O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Cumbreño Galindo

Telephone No. +34 91 349 96880

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1 and 3
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 1 and 3 do not clearly define the subject matter for which protection is sought. The features which are defined therein are not clear, owing to the fact that they contain ambiguous terms, it therefore not being possible to examine the claims with regard to novelty and inventive step. In the claims, the phrase "situated in proximity to the amino acid 380b" does not make it clear to which amino acids specific reference is being made.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2007/070104

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GRAZÚ, V. Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. Biotechnology and Bioengineering, June 2005. Vol. 90, Nº 5, pages 597-605 (the whole document).	2, 4-10

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 11/08 (2006.01)

C12N 9/84 (2006.01)

C12P 37/04 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2007/070104

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, STN

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	GRAZÚ BONA VÍA, M.V. Resumen de la Tesis Doctoral: Estabilización de penicilina G acilasa por inmovilización covalente multipuntual dirigida. Mutagénesis de la superficie de la enzima para mejorar la complementariedad enzima-soporte activado [en línea]. Universidad Autónoma de Madrid. Año 2005 [recuperado el 01-10-2007]. Recuperado de Internet: <URL:http://www.kriptia.com/QUIMICA/BIOQUIMICA/GENETICA_BIOQUIMICA/1	2, 4-10
A	ABIAN, O. Stabilization of penicillin G acylase from <i>Escherichia coli</i> : site-directed mutagenesis of the protein surface to increase multipoint covalent attachment. Applied and Environmental Microbiology. Febrero 2004. Vol. 70, Nº 2, páginas 1249-1251. ISSN 0099-2240 (todo el documento).	2, 4-10

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
02.Octubre.2007 (02.10.2007)	02 de octubre de 2007 (02/10/2007)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado M. Cumbreño Galindo Nº de teléfono +34 91 349 96880
--	--

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES 2007/070104

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	GRAZÚ, V. Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports. Biotechnology and Bioengineering, Junio 2005. Vol. 90, Nº 5, páginas 597-605 (todo el documento).	2, 4-10

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2007/070104

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. ☒ Las reivindicaciones n^{os}: 1 y 3
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
La reivindicaciones 1 y 3 no definen claramente el objeto cuya protección se pretende. Las características que definen no están indicadas claramente, debido a que contienen términos ambiguos y no es posible, por lo tanto, examinar estas reivindicaciones con respecto a su novedad y actividad inventiva. En dichas reivindicaciones la expresión “situados en las proximidades del aminoácido 380b” no deja claro a qué aminoácidos en concreto se refiere.
3. ☐ Las reivindicaciones n^{os}:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n^{os}:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n^{os}:

- Indicación en cuanto a la protesta
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
 - ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
 - ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 11/08 (2006.01)

C12N 9/84 (2006.01)

C12P 37/04 (2006.01)